

## 蜂蜜酒の開発

大橋正孝<sup>\*1)</sup>，首藤明子<sup>\*1)</sup>，都築正男<sup>\*1)</sup>，岡本雄二<sup>\*2)</sup>，清水浩美<sup>\*1)</sup>

### Development of Honey Wine

OHASHI Masataka<sup>\*1)</sup>，SYUTO Akiko<sup>\*1)</sup>，TSUDUKI Masao<sup>\*1)</sup>，OKAMOTO Yuji<sup>\*2)</sup>，SHIMIZU Hiromi<sup>\*1)</sup>

蜂蜜酒の開発を検討した結果、蜂蜜を5倍希釈した後、発酵促進剤として米麴を加え、さらに清酒酵母を加えて、培養することによって、発酵が促進し、アルコール濃度約8%程度の蜂蜜酒が得られた。得られた蜂蜜酒はぬか臭が感じられ、酢酸が非常に多いアルコール飲料であった。

#### 1. 緒言

全国の清酒消費量の推移を見ると、最も消費された昭和50年には1,675千kLだったのが、平成22年には589千kLと約35%程度にまで減少している<sup>1)</sup>。これは、清酒の仕込み配合等が旧態依然であり、清酒のほとんどのものが、既存の醸造協会系酵母を使用して製造され、その個性がなくなっていること、さらに果汁を使用した低アルコール飲料を飲まれているため、清酒に抵抗感のある若年層の清酒離れが進んでいることに代表されるように、消費者の嗜好の変化に十分対応しきれていないことも要因の一つとして考えられる。清酒で減少した消費量をおぎなうべく、別の低アルコール飲料の開発が求められている。そこで、全国的に広く愛飲されていない蜂蜜酒に着目し、低アルコール飲料で、甘味と酸味のバランスのとれた蜂蜜酒の開発を検討した。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 試薬

有機酸の酒石酸、ギ酸、ピルビン酸、リンゴ酸、マロン酸、酢酸、乳酸、マレイン酸、クエン酸、フマル酸、ピログルタミン酸、コハク酸、香り成分の酢酸エチル、酢酸イソブチル、酪酸エチル、酢酸イソアミル、カプロン酸エチル、カプリル酸エチル、プロパノール、イソブタノール、イソアミルアルコール、内部標準物質のアミルアルコール、カプロン酸メチル、その他試薬のメタノール、クロロホルム、0.1M水酸化ナトリウム溶液（容量分析用）、0.1M塩酸溶液（容量分析用）、アセトン、アセトニトリル、超純水、リン酸二水素ナトリウム、パントテン酸は、和光純薬工業株式会社製を用いた。酵母エキスはDIFCO社製を用いた。ペプトンはBD社製を用いた。YPD培地はD-(+)グルコース2%、酵母エキス1%、ペプトン2%を水に加え、オートクレーブで滅菌して調製した。麴汁液体培地は、米麴1kgに水3,000mLを加えて55°Cで一晩加温後ろ過搾汁して得

られた麴汁をBrix10となるように水で希釈した後、乳酸でpHを3.5に調整してからオートクレーブで滅菌した。固相抽出カートリッジはWaters社製Sep-pak Accell plus QMAを用いた。

##### 2.2 装置

Brixは、株式会社アタゴ製デジタル糖度計PR-100を用いて測定した。培養は、トーマス科学器械株式会社製振とう培養器AT-12R及びタバイエスペック株式会社製炭酸ガス培養器BNA-111を用いた。アルコールは理研計器株式会社製アルコメイトAL-2を用いて測定した。12種類の有機酸は、Waters社製UPLCを用いて測定した。9種類の香り成分は、株式会社島津製作所製GC-MS QP2010を用いて、ヘッドスペース法で測定した。遠心分離は、株式会社久保田製作所製テーブルトップ遠心機5220を用いた。

##### 2.3 原材料及び製造方法

蜂蜜は、市販の蜂蜜を用いた。添加する酵母は、蜂蜜にイメージの合うナラノヤエザクラ酵母を用いた。米麴は、乾燥麴を用いた。発酵促進剤としてパントテン酸、米麴を用いた。

蜂蜜25gに水を95mL添加し、発酵促進剤を加えて、あらかじめ培養した酵母培養液5mLを添加し、30°Cで12日間培養した。1日ごとに重量を測定し、減量分を炭酸ガス減量として算出し、発酵経過をモニターした。培養終了後、遠心分離し、65°Cで30分間低温加熱殺菌を行い、蜂蜜酒とした。

##### 2.4 酵母の添加量

酵母の添加のみではアルコール分2~3%程度で発酵が止まってしまうが、アサヒビール株式会社が特許化している技術<sup>1)</sup>によると、蜂蜜希釈水に $4 \times 10^7 \sim 12 \times 10^7$ cfu/mLという大量の酵母を添加してアルコール発酵を行うと、8%程度の蜂蜜酒をつくるのが可能である。通常、酵母をYPD

\*1) バイオ・食品グループ \*2) リビングサイエンス先導的研究開発グループ

培地で30℃、24時間振とう培養を行うと約 $1 \times 10^8$ cfu/mLまで酵母は増殖できる。この技術に記載の酵母を添加するためには、蜂蜜希釈液100mLに対して、 $4 \times 10^9 \sim 12 \times 10^9$ cfu/mLの酵母を添加する必要がある、振とう培養した酵母を10倍濃縮した液を、4~12mL加えないといけない。濃縮する手間がかかり、コストもかかる。そこで、今回、この特許を回避することと、より少ない酵母でアルコール発酵を行うことを目標として、蜂蜜希釈液に $3 \sim 10 \times 10^5$ cfu/mLとなるように酵母を添加し、アルコール発酵するかどうかを検討した。この場合、YPD培地で30℃、24時間振とう培養を行って得られる酵母(約 $1 \times 10^8$ cfu/mL)を蜂蜜希釈液100mLに対して1mL程度加える程度でよく、手間及びコストもかからない。

酵母培養液は、-80℃保存菌株からYPD5mLで前培養後(30℃、一晚振とう培養)、麴汁液体培地5mLで30℃、24時間振とう培養した液を、 $OD_{600nm}=20$ 菌量添加となるよう麴汁液体培地で希釈したのち、全量添加した。

## 2.5 有機酸分析

下記の方法で前処理を行い、得られたサンプル溶液をUPLCに注入し、絶対検量線により有機酸の定量を行った。

- (1) 蜂蜜酒1mLを10mL試験管に採取し、アセトンを加えて10mLに定容する。
- (2) 0.45  $\mu$ mメンブレンフィルターでろ過し、その溶液2mLを10mL試験管に採取し、水で10mLにする。
- (3) あらかじめ水及び0.1M NaOHで平衡化した固相抽出カートリッジに全量負荷した。
- (4) 水10mLで3回洗浄し、0.1M塩酸溶液で溶出し、UPLCサンプル溶液とした。

12種類の有機酸成分は酒石酸、ギ酸、ピルビン酸、リンゴ酸、マロン酸、乳酸、酢酸、マレイン酸、クエン酸、フマル酸、ピログルタミン酸、コハク酸である。

UPLCの測定条件は下記のとおりである。

カラム：Acquity UPLC HSS T3 (2.1×150mm, 1.8 $\mu$ m)

カラム温度：30℃、注入量：6 $\mu$ L、UV測定波長：210nm

移動相 A 80%アセトニトリル

B 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH2.8)

Gradient 条件

時間 (分)	流量 (mL/分)	A	B
0	0.5	0	100
5	0.5	0	100
6	0.5	70	30
7	0.5	0	100
10	0.5	0	100

## 2.5 香り成分の分析

蜂蜜酒1.8mLと内部標準液(アミルアルコール、カプロ

ン酸メチル含有)0.2mlをバイアルに採取し、キャップで固く締める。バイアルをヘッドスペースオートサンプラーGC-MS QP2010にセットして、香り成分を測定した。GC条件及びヘッドスペース条件は下記のとおりである。

### 【GC条件】

カラム HP-INNOWax (0.25mm i.d.×60m, 0.25 $\mu$ m)

昇温条件 40℃(5分)-4℃/分-60℃-1℃/分-70℃-10℃/分-120℃-15℃/分-240℃(5分)

スプリット比 5:1

注入温度 200℃

### 【ヘッドスペース条件】

Oven 温度 70℃ 30分;注入温度 200℃

9種の香り測定成分は酢酸エチル、酢酸イソブチル、酪酸エチル、酢酸イソアミル、カプロン酸エチル、カプリル酸エチル、プロパノール、イソブタノール、イソアミルアルコールである。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 パントテン酸添加によるアルコール発酵への影響

穂坂らの特許文献<sup>2)</sup>によると、蜂蜜液には酵母の必須栄養素であるパントテン酸が含まれておらず、酵母を $1 \times 10^8$ cfu/mL添加しないと十分な発酵が行われないので、パントテン酸を5~20 $\mu$ g/mL加えることが望ましいとされている。そこで、蜂蜜25gに水95mL加えて希釈した後、酵母培養液5mL、乳酸0.19mL、パントテン酸を0, 5, 10, 20 $\mu$ g/mLとなるように添加して、30℃で培養を行った。

酵母は、グルコースを下記の化学式のとおり、二酸化炭素とエタノールに分解する。



二酸化炭素は系外に飛散し、その分、蜂蜜培養液の重量が軽くなる。そこで、重量の差を炭酸ガス減量(CO<sub>2</sub> emission)として測定することで、エタノール生成すなわちアルコール発酵能をみる事が可能となる。24時間ごとに重量を測定した経過を図1に示す。B17はナラノヤエザクラ酵母をさす。Pant0, 5, 10, 20ppmは、それぞれパントテン酸を0, 5, 10, 20 $\mu$ g/mL添加したロットである。CO<sub>2</sub>emission(g)が大きいほど、アルコール発酵が行われていることを示す。

図1に示すように、パントテン酸を添加するほどアルコール発酵能が下がる傾向が得られた。パントテン酸の添加によるアルコール発酵への影響は非常に少なく、表1に示すように、アルコール生成も1.5~1.6%と低く、パントテン酸添加の効果はなかった。上槽前の生菌数を見ると、 $3 \sim 7 \times 10^5$ cfu/mLと仕込み開始とほぼ変化がなかった。

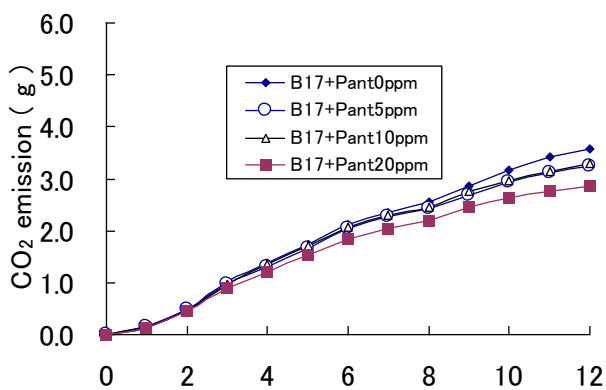


図1 パントテン酸添加による発酵曲線 日

表1 蜂蜜酒のアルコール濃度

サンプル	Alcohol (%)
B17+Pant0ppm	1.6
B17+Pant5ppm	1.6
B17+Pant10ppm	1.5
B17+Pant20ppm	1.5

### 3.2 米麴添加によるアルコール発酵への影響

穂坂ら<sup>2)</sup>, 上田ら<sup>3)</sup>の特許文献によると, 米麴を添加するとアルコール発酵が促進される. そこで, アルコール発酵能をあげるため, 蜂蜜25gに水95mLを加え, 米麴を0, 1, 2, 5, 5g添加し酵母培養液5mLを添加して30°C, 12日間培養し, 炭酸ガス減量により発酵能をモニターした. 図2に示すように米麴添加量依存的にアルコール発酵能が促進され, 米麴5g添加が一番早い結果となった.

米麴5g添加すると, 8日目までCO<sub>2</sub>emission(g)が9gを超えたアルコール濃度及びBrixは, 表2に示すとおりである.

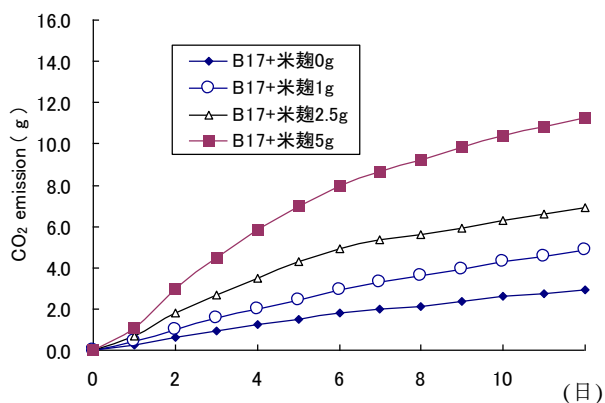


図2 米麴添加による発酵曲線

表2 アルコール濃度及びBrix

サンプル	Alcohol (%)	Brix (%)
B17	1.9	14.9
B17+米麴1g	3.4	13.3
B17+米麴2.5g	5.8	11.0
B17+米麴5g	9.8	7.0

Brixは糖度を表す指標である. 酒造の現場で容易に測定することができ, この数値をモニターして発酵を推定することが可能である.

米麴の添加量が増えるごとにアルコール濃度が高くなり, Brixが下がった. 官能検査を行ったところ, 米麴添加が1g以下の場合, 蜂蜜液の味で甘味が強く, アルコール飲料としては不適格であった. 米麴2.5g添加の場合, 甘味と酸味のバランスが良く, アルコールも少し感じる飲料となっていたが, むか臭を少し感じた. 米麴5g添加では, 甘味をほとんど感じず, 酸味が強く, アルコールも少し強く感じた. 麴臭もあり, 後味が悪かった. 官能検査の結果, アルコールが7~9%でBrix10前後(推定CO<sub>2</sub>emission(g)8.7~9.8g)を目標とした蜂蜜酒の醸造が適当と結論づけた.

米麴の表面積を上げるために, 米麴を粉碎し, 粉碎した粉碎米麴を0, 1, 2.5, 5g添加した系でも培養したが, 粉碎しない米麴とほとんど差がなかった. 従って, 米麴は粉碎する必要はない.

### 3.3 麴汁液体培地添加によるアルコール発酵への影響

特許文献にあるように, 米麴を加えるだけでアルコール発酵があがることを再現できた. 培養後ろ過する際に米麴の形状がほとんど変化していなかったため, アルコール発酵能があがる原因は, 米麴から蜂蜜水に放出される成分(ある種のタンパク質など)が寄与している可能性が考えられた. そこで, 米麴を糖化してつくる麴汁液体培地の添加によるアルコール発酵への影響を検討した.

蜂蜜25gに水を加え, 0.20µmメンブレンフィルターでフィルター滅菌した麴汁液体培地0, 1, 2.5, 5gを加え, 水95mLを添加し, 酵母培養液5mLを加えて30°Cで12日間培養し, 炭酸ガス減量により発酵能をモニターした.

図3に示すように, 麴汁液体培地を添加しても, アルコール発酵能はあまり上がらず, アルコール濃度も表3に示すように, 2.7%までしか上昇しなかった.

### 3.4 米麴添加による蜂蜜酒の作成

アルコールが7~9%となるような蜂蜜酒を醸造するために, CO<sub>2</sub>emission(g)が8.7~9.8gとなるところで発酵を止めるために, あらかじめ, 蜂蜜25gに乳酸0.19mL, 水100mL, 米麴5gを添加して, 30°Cで, 9日間培養した. 得られた液を遠心分離後, アルコール測定を行ったところ, 8.1%とほどよい蜂蜜酒となった. 官能検査では, どちらも麴臭, むか臭があり, あまりアルコールを感じないが, 酸味がきいていたが, 雑味を感じた.

得られた蜂蜜酒の有機酸組成を調べたところ, 表4に示すように, リンゴ酸が少なく, コハク酸と酢酸が非常に多く含まれていることが分かった. 酢酸は, 清酒に含まれるとよくない酸臭(軽微な腐造臭)を呈する<sup>4)</sup>ため, 多く含

まれる場合、清酒として不適となる成分である。今回の蜂蜜酒のそれほど気にはならなかったが、臭いに敏感な人には感じられるかもしれない。酢酸は、ピルビン酸から生成するアセチル-CoA やアセトアルデヒドから生成する。それらの反応を触媒する酵素をコードしているのは、ACH1 や ACS1 などである。米麴でアルコール発酵した場合、これらが活性化している可能性がある。

得られた蜂蜜酒の香気成分を測定すると、酢酸エチルが  $17.7\mu\text{m/mL}$ 、プロパノールが  $27.7\mu\text{m/mL}$  と顕著に高く、カプロン酸エチルが  $0.1\text{mm/mL}$ 、酢酸イソアミルは  $0.1\text{mm/mL}$  と非常に低い値であった。

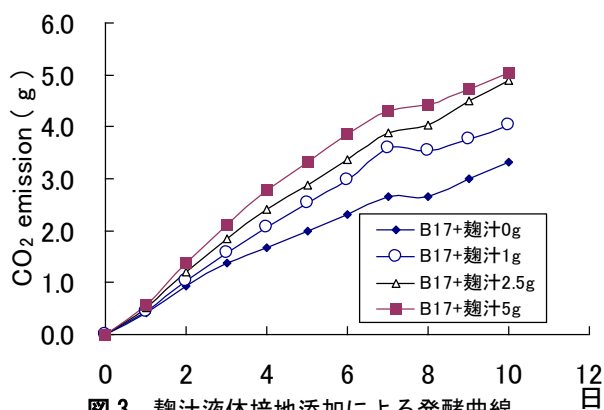


図3 麹汁液体培地添加による発酵曲線

表3 アルコール濃度

サンプル	Alcohol (%)
B17+麹汁0g	1.7
B17+麹汁1g	1.9
B17+麹汁2.5g	2.3
B17+麹汁5g	2.7

表4 有機酸組成

サンプル名	単位: $\mu\text{g/mL}$				
	ピルビン酸	リンゴ酸	乳酸	酢酸	コハク酸
B17+米麴 5g	190	103	1874	1134	1307

### 3.5 今後の課題と問題点

米麴を添加することにより、アルコール約 8%程度の蜂蜜酒ができたが、ぬか臭、麴臭があり、酢酸が多く、雑味も感じられ、官能的によいとはいえなかった。麴以外の発酵促進剤を探索する必要がある。

## 4. 結言

5倍希釈した蜂蜜水に米麴を添加して、 $30^{\circ}\text{C}$  9日間発酵させた結果、アルコール濃度 8.1%の蜂蜜酒をつくることができた。ただ、ぬか臭、麴臭があり、酢酸が多く、雑味も感じられ、官能的によい蜂蜜酒とはいえなかった。

## 参考文献

- 1) 河野克典, 伊藤かおり, 特許第3121872号, 「蜂蜜発酵酒の製造方法」, アサヒビール株式会社.
- 2) 穂坂賢, 村清司, 特願2006-197933, 「蜂蜜酒の製造方法」, 東京農業大学.
- 3) 上田誠之助, 寺本祐司, 特開平11-341974, 「蜂蜜発酵酒の開発」, 株式会社杉養蜂園.
- 4) 山田 正一, 藤井 竜二, 吉沢 淑, 「清酒腐造もろみ悪臭の本体について」, 日本農芸化学会, 33, 195-197(1959).